



10/Declaration
1.132

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

TECHNOLOGY CENTER 1600/2900

OCT 10 2003

RECEIVED

In re the application of

Confirmation No. 1385

M. KATAYAMA et al.

Group Art Unit: 1616

Application No. 09/931,193

Examiner: PRYOR, ALTON NATHANIEL

Filed: Aug. 15/2001

Docket No.: HIR-139

For: Roots-Inducing Agent of Plants and Its Treatment Method

DECLARATION UNDER 37 C.F.R. §1.131

Commissioner For Patent s
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

I, Masato KATAYAMA, a citizen of Japan, hereby declare and state:

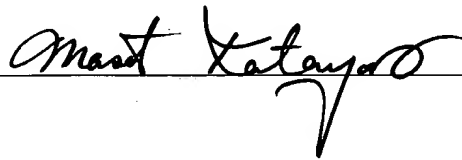
1. I have a doctor degree of Agriculture, which was conferred upon me by Nagoya University in Nagoya in 1978.
2. I have been first employed by the Noda Scientific Institute (Noda city, Japan) since 1978 and I have had a total of 24 years of work and research experience in Organic Chemistry and Natural Product Chemistry.
3. I am one of the Applicants and inventors of the claimed invention. I have a complete understanding and knowledge of the claims. The claimed invention was actually reduced to practice before the date of December 21, 1998.

4 I enclose as evidence of my claimed invention the document entitled Annual Report of FY 1996 "Development of Plant Growth Regulators and Their Application to Tapioca". This paper was presented to supervisors of the project memorialising the results of testing involving the compound 4-chloroindole-3-acetic acid and the application of the compound to tapioca leaves by spraying which increased the growth of the roots. This is evidence of actual reproduction to practice before the date of December 21, 1998. The paper was not available to the public, only to supervisors and management of the staff of the National Industrial Research Institute of Nagoya of which ownership of the patent belongs. The enclosed copy is an English translation of the original Japanese report.

5 I enclose a copy of the original Japanese language report to the management of NIRIN. The original document describes the application of the claimed component to the leaves of plants to cause root growth. The claimed compound of claim 5 is fully supported by the enclosed exhibits.

6. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true, and that all statements made on information and belief are believed to be true, and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine and/or imprisonment under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing therefrom.

Date: September 4, 2003



ATTACHMENTS: Development of Plant Growth Regulators and Their Application
to Tapioca (English translation)
Japanese language of the above document

Masato Katayama

Annual Report of FY 1996

Development of Plant Growth Regulators and Their Application to Tapioca

Masato KATAYAMA and Hiroshi KIMOTO, *Laboratory of Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry, National Industrial Research Institute of Nagoya (NIRIN), Agency of Industrial Science and Technology (AIST)*

NIRIN has a cooperating research project with Thai Tapioca Development Institute (TTDI) for improving the yield of tapioca production by using plant growth regulators (PGRs) developed by NIRIN's group.

Results:

(Research in Japan)

1. Synthesis of PGRs

A large-scale synthesis of 4-chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA) and 4,4,4-trifluoro-3-(3-indolyl)butyric acid (TFIBA) was succeeded as shown in Fig.1 and 2.

Fig.1

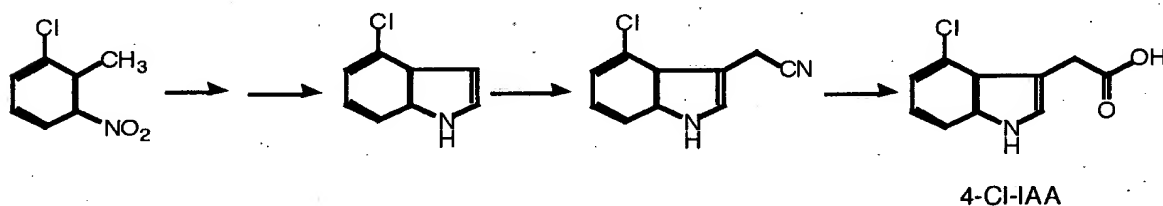
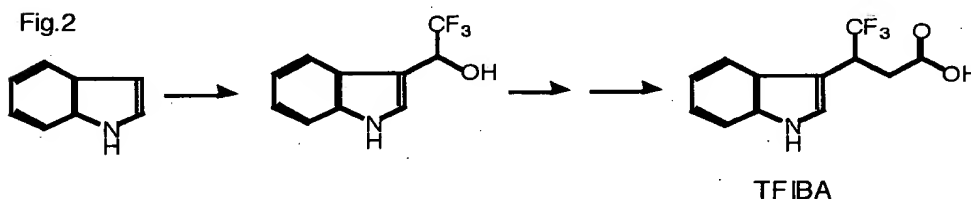


Fig.2



(1) 4-Cl-IAA was synthesized from 2-chloro-6-nitrotoluene as a starting material via 4-chloroindole and 4-chloroindole-3-acetonitrile.

(2) TFIBA was synthesized from indole and trifluoroacetaldehyde hemiacetal as starting materials

2. Biological Activities of synthetic PGRs

Mad K. L. S.

- (1) To black gram, swelling and lateral root formation activities of synthetic 4-Cl-IAA were 100 – 1000 times higher than those of indole-3-acetic acid (IAA).
- (2) In the *Avena* coleoptile elongation test, the activity of 4-Cl-IAA was much higher than that of IAA.
- (3) 4-Cl-IAA also promoted root formation in *Serissa japonica* and Eucalyptus.
- (3) TFIBA promoted strongly root growth in Chinese cabbage, rice, lettuce at the very low concentration.
- (4) In the field test, TFIBA had interesting activities, for example, yield increase of potato, tillering promotion of rice and wheat, ripening promotion of tomato and grape and promotion of germination and growth of oak seeds.

(Research in Thailand)

1. Application test of PGRs to Tapioca

- (1) PGRs (4-Cl-IAA and TFIBA) increased 15 – 25% of yield of tapioca tubers by spray treatment (Concentration: 12 ppm) (Fig. 3 & 4).
- (2) In root formation test with 4-Cl-IAA, it increased 30% of rooting rate by soaking tapioca stems into its ethanol-water solution (Fig. 5).



Fig.3

Growth promotion of tapioca tubers
by spray treatment with 4-Cl-IAA
Right : 4-Cl-IAA 12ppm
Left : Control



Fig.4

Growth promotion of tapioca tubers
by spray treatment with TFIBA
Right : TFIBA 12ppm
Left : Control



Fig.5

Root formation-promoting activity of 4-Cl-IAA
by soaking to tapioca stems
Right : 4-Cl-IAA 25ppm
Left : Control

Must Katsuyasu

植物成長調節物質(PGR)の開発とタピオカへの応用に関する研究

(平成8年度～平成11年度)

(研究所名) 名古屋工業技術研究所
(所属名) 化学部
生物有機化学研究室
(参画研究者) 片山 正人
木本 博

1. はじめに

タピオカはアフリカ、南アメリカをはじめ東南アジア諸国で栽培され食料として利用されている。その中でタイ国では直接の食料ではなく、多くは乾燥チップやペレットの形でEU諸国に家畜飼料として、また粉末澱粉として日本をはじめ中国、台湾等の諸国に輸出している。タイ国のタピオカの主生産地域である東北部では雨期を除いてはその地域の土壌は乾燥し、しかも痩せているためにこの地域の農民は米などの主要穀物は僅かしか生産できず、その結果このような土壌でも生育できるタピオカを栽培している。しかしながら、農民の生産技術は徐々に向上はしているものの非常に低いためにその生産性は低く、極めて低い生活水準を余儀なくされている。

タイ政府はこうした農民の生活水準の向上、ひいてはタイ国民の生活の向上、安定化のためにタイ・タピオカ開発研究所(The Thai Tapioca Development Institute, TTDI)を中心にタピオカの生産向上と価格の安定化に最大限の努力を払っている。その一つとしてTTDIは「タピオカの生産向上のためのPGRのタピオカへの応用」についての研究協力を当所に要請した。本研究は国際研究協力としてこの要請に応じてタピオカの生産向上のためのPGRの開発とタイ国における応用試験を行うものである。

2. 研究内容及び成果

(国内研究)

応用試験のために2種のPGR(4-クロロインドール-3-酢酸(4-Cl-IAA)及び4,4,4-トリフルオロ-3-(インドール-3-) 酪酸(TFIBA))をFig.1及び2に示した経路で大量合成すること成功した。

Fig. 1

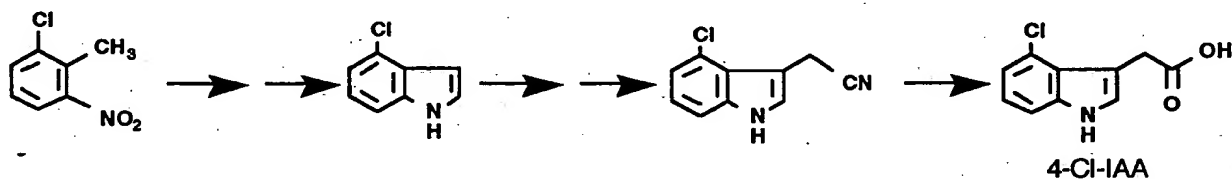
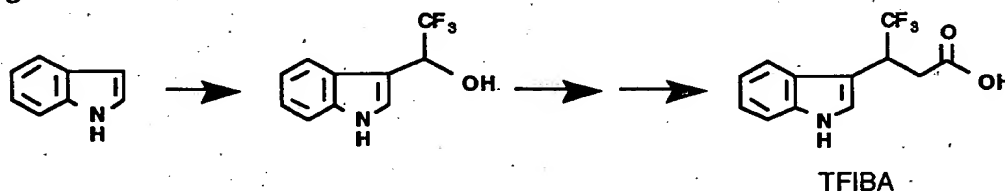


Fig. 2



即ち、4-Cl-IAAについては2-クロロ-6-ニトロトルエンを出発物質として4-クロロインドール、さらには4-クロロインドール-3-アセトニトリルを経て合成した。一方、TFIBAについてはインドールをトリフルオロアセトアルデヒドヘミアセタールと縮合して容易に得られる2,2,2-トリフルオロ-1-(インドール-3-)エタノールをさらにマロン酸ジエチルのナトリウム塩と加熱カップリング後、加水分解、脱炭酸を

Mart Katsuyoshi

行って高収率で合成した。

合成した4-Cl-IAAは基礎的生物試験の結果、ブラックマッペに対して既存のオーキシンであるIAAの100~1000倍強力な胚軸のswellingと側根形成活性や白菜に対する強力な下胚軸の伸長抑制活性を示し、また、アベナを用いた子葉鞘伸長試験においても極めて強力なオーキシン活性を示すこと、さらにオーキシン活性の一つである発根試験においてもハクチョウゲ、ユーカリ等に対して極めて強力な発根促進活性を示すことが明らかになった。

一方、TFIBAは基礎的生物試験では極低濃度で白菜、イネ、レタス等に対して極めて強い根の成長促進活性を示し、圃場における応用試験においてもジャガイモの増収、イネや麦の分けつ促進、トマト、ブドウ等の成熟促進、ドングリの発芽・生育促進活性等数多くの極めて興味ある活性を示した。

(在外研究)

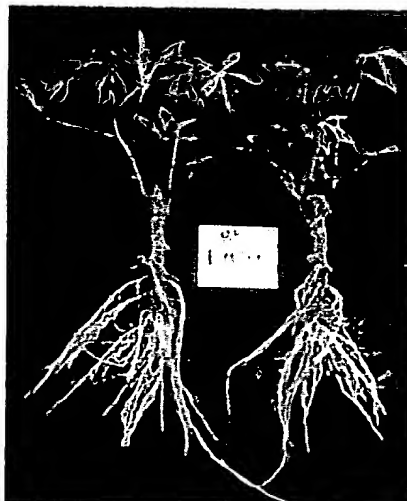
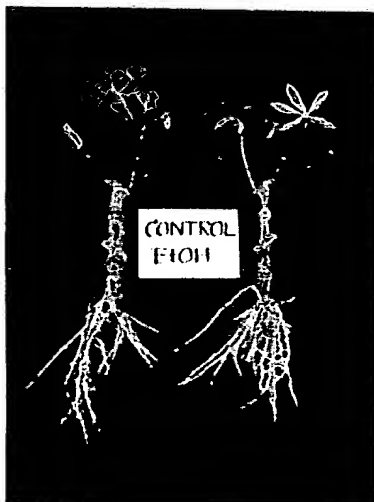
タイ国におけるタピオカに対する応用試験においては、散布処理によって合成両PGR（濃度：12ppm）は共にタピオカのイモの成長を15%~25%促進した（Fig. 3及び4）。さらに、4-Cl-IAAについては浸漬処理法によって発根促進を行うことによるタピオカイモの増収が可能か否かについての予備的試験も実施した。その結果、タピオカ茎を4-Cl-IAAのエタノール水で2~5分間処理することによって発根率が約30%増加した（Fig.5）。



4-Cl-IAA散布処理によるタピオカイモの生育促進作用
右：4-Cl-IAA 12ppm
左：対照区



TFIBA散布処理によるタピオカイモの生育促進作用
右：TFIBA 12ppm
左：対照区



4-Cl-IAA浸漬処理によるタピオカ茎に対する発根促進作用
右：4-Cl-IAA 25ppm
左：対照区

Must Katayama

3. まとめ

我々が合成した2種の植物成長調節物質のうち4-Cl-IAAは国内における基礎的生物学試験の結果、ハクチョウゲ等に対して強力な発根作用を示したのをはじめブラックマッペの下胚軸に対する強力なswelling及び側根形成活性、白菜の下胚軸成長抑制作用等を示し、既存のホルモン剤に比較にならないほど強力な活性を示した。一方、もう一つの植物成長調節物質であるTFIBAはイネ、白菜、レタス等に対して強力な根の成長促進活性を示すと共に、圃場における応用試験でも、ジャガイモの増収、イネや麦の分けつ促進等数多くの極めて興味ある活性を示した。

タイ国におけるタピオカに対する応用試験においては使用した2種の植物成長調節物質が散布処理によってタピオカのイモの成長を顕著に促進することが分かった。さらに、4-Cl-IAAは浸漬処理によって発根を顕著に促進することも明らかになった。今後これらのPGRを用いた更なる応用試験を計画しているが、タピオカに対する応用試験が1年に限られた時期にしか実施できないこともあり、国内での基礎的や応用試験を含めてより効率的な試験を実施する予定である。また、より高活性化合物の開発も進めており、その応用成果に期待したい。

研究発表

(誌上発表)

1. M. KATAYAMA, R. K. GAUTAM, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 755-759 (1996).
Synthesis and Biological Activities of Substituted 4,4,4-Trifluoro-3-(indole-3-)butyric acids, Novel Fluorinated Plant Growth Regulators.
2. K. KATO, M. KATAYAMA, S. FUJII, H. KIMOTO, *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 355-360 (1996).
Effective Preparation of Optically Active 4,4,4-Trifluoro-3-(Indole-3-)butyric Acid, a Novel Plant Growth Regulator, Using Lipase from *Pseudomonas fluorescens*.
3. K. KATO, M. KATAYAMA, S. FUJII, H. KIMOTO, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 194-196 (1997).
Enzymatic Resolution of 2,2,2-Trifluoro-1-(1-pyrenyl)ethanol with Lipases.
4. 加藤且也、日比野智尚、藤井省造、片山正人、木本 博、名古屋工業技術研究所報告, **46**, 54-60 (1997).
酵素(リパーゼ)を用いた立体選択的加水分解反応(1)-アルコール側の形状・性質がリパーゼの反応性と立体選択性に及ぼす影響

(口頭発表)

1. 加藤且也、片山正人、藤井省造、木本 博、第20回フッ素化学討論会(名古屋)、10月 (1996).
2,2,2-トリフルオロ-2-(アリール)エタノールの酵素による光学分割

(特許)

1. 片山正人、藤井省造、加藤且也、木本 博：置換含フッ素 β -インドール酪酸類及びそれを有効成分として含有する植物生長調節剤(1996年6月登録)
2. 片山正人、藤井省造、加藤且也、木本 博：イネ科植物用分けつ剤(1996年6月登録)